

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.11.40-46>

Применение технологии CRISPR/Cas для создания сублинии клеток рака легкого A549 с нокаутом гена E2F1

Замкова М.А.^{1,2}, Казанский Д.Б.², Татарский В.В.¹

1 – Институт биологии гена Российской академии наук
119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

2 – ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России
115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

Несмотря на значительное количество исследований, посвященных транскрипционному фактору E2F1, его функциональная роль в клеточных процессах остаётся неоднозначной. В зависимости от контекста E2F1 может либо поддерживать выживание клеток, либо инициировать апоптоз. Настоящая работа посвящена рассмотрению возможности использования E2F1 в качестве терапевтической мишени для комбинированного лечения злокачественных новообразований, в том числе через применение ингибиторов. Однако имеющиеся данные также свидетельствуют о потенциально противоположном эффекте E2F1, способном негативно влиять на эффективность терапии. Это подчёркивает актуальность углублённого изучения функциональной активности E2F1 в различных условиях. Факторы транскрипции семейства E2F, включая E2F1, демонстрируют как пересекающиеся функции, так и уникальные свойства, присущие отдельным его членам. Подавление экспрессии отдельных представителей семейства даёт возможность более точно оценить их вклад в ключевые клеточные процессы. В рамках проведённого исследования была разработана сублиния клеток рака лёгкого A549 с нокаутом гена E2F1, осуществлённым с использованием технологии CRISPR/Cas. На основе данной клеточной модели планируется проведение экспериментов, направленных на изучение роли E2F1 в различных условиях, включая реакции на химиотерапевтические воздействия.

Ключевые слова: CRISPR/Cas, sgPHK, E2F1, нокаут.

Для цитирования: Замкова М.А., Казанский Д.Б., Татарский В.В. Применение технологии CRISPR/Cas для создания сублинии клеток рака легкого A549 с нокаутом гена E2F1. *Медицинская генетика* 2024; 23(11): 40-46.

Автор для корреспонденции: Замкова М.А.; e-mail: zamkovam@gmail.com

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 24-24-00293, <https://rscf.ru/project/24-24-00293/>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 19.11.2024

Using CRISPR/Cas technology to generate A549 human lung cancer subline with knockout of the E2F1 gene

Zamkova M.A.^{1,2}, Kazansky D.B.², Tatarskiy V.V.¹

1 – Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences
34/5, Vavilova st., Moscow, 119334, Russian Federation

2 – National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin of the Ministry of Health of the Russian Federation
23, Kashirskoe shosse, Moscow, 115522, Russian Federation

Despite a significant number of studies devoted to the transcription factor E2F1, its functional role in cellular processes remains ambiguous. Depending on the context, E2F1 can either support cell survival or initiate apoptosis. The present work is devoted to the possibility of using E2F1 as a therapeutic target for the combined treatment of malignant neoplasms, including through the use of inhibitors. However, the available data also indicate a potentially opposite effect of E2F1, which can negatively affect the effectiveness of therapy. This emphasizes the relevance of an in-depth study of the functional activity of E2F1 in various conditions. Transcription factors of the E2F family, including E2F1, demonstrate both overlapping functions and unique properties inherent in its individual members. Suppression of the expression of individual representatives of the family makes it possible to more accurately assess their contribution to key cellular processes. As part of the study, a subline of A549 lung cancer cells with a knockout of the E2F1 gene, carried out using CRISPR/Cas technology, was developed. Based on this cell model, experiments are planned to be carried out aimed at studying the role of E2F1 in various conditions, including responses to chemotherapeutic effects.

Keywords: CRISPR/Cas, sgPHK, E2F1, knockout.

For citation: Zamkova M.A., Kazansky D.B., Tatarskiy V.V. Using CRISPR/Cas technology to generate A549 human lung cancer subline with knockout of the E2F1 gene. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(11): 40-46. (In Russian)

Corresponding author: Zamkova M.A.; **e-mail:** zamkovam@gmail.com

Funding. The work was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 24-24-00293, <https://rscf.ru/project/24-24-00293/>.

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 19.11.2024

Введение

В современных исследованиях для идентификации роли определенных генов или их продуктов в развитии клеточного ответа на специфические внешние воздействия используются различные модельные клеточные линии. В частности, для доказательства ключевого участия гена в изучаемом процессе исследователи применяют методику «выключения» экспрессии этого гена (нокдаун и/или нокаут), либо, наоборот, оверэкспрессируют изучаемый ген [1, 2]. Таким образом, удается оценить его вклад в исследуемый процесс. Наиболее эффективным методом создания нокаутных сублиний клеток в настоящее время считается технология CRISPR/Cas [3], позволяющая модифицировать определенные участки в молекуле ДНК. Нуклеаза Cas9 с помощью специфической sgРНК «подводится» к целевому месту в геноме, где делает двухцепочечный разрыв молекулы ДНК, который в дальнейшем репарируется путем негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ), либо, при наличии специфичной матрицы, с помощью гомологичной репарации (homology-directed repair (HDR)). Применение данной технологии позволяет не только оценить вклад определенного гена в исследуемый процесс, но и проводить скрининг генов с целью идентификации потенциальных кандидатов на роль ключевых участников в ответе клетки на определенное воздействие [4].

Транскрипционный фактор E2F1 участвует в регуляции различных клеточных процессов: прогрессии клеточного цикла, апоптозе, метаболизме [5]. Семейство E2F помимо E2F1 включает в себя факторы E2F2, E2F3a и E2F3b (транскрипционные активаторы), E2F4, E2F5 (репрессоры) и E2F6, E2F7 и E2F8 (ингибиторы) [6]. Вместе с белком ретинобластомы (Rb) представители семейства E2F участвуют в прогрессии клеточного цикла, регулируя переход из G1 в S фазу [5]. E2F1 является наиболее изученным представителем этого семейства, однако до сих пор многие аспекты его функционирования остаются непонятными. Парадоксальна его роль в процессах, связанных с жизнеспособностью клеток: с одной стороны, он способствует транскрипции генов, участвующих в пролиферации, с другой стороны, может вызывать развитие апоптоза [5, 6]. Мишенями E2F1 также являются гены, ответственные за развитие ответа клетки на вызванные

различными воздействиями повреждения в ДНК, ангиогенеза и др. [7]. Показана его неоднозначная роль в ответе опухолевой клетки на действие химиопрепаратов [8]. Так, высокий уровень экспрессии E2F1 может быть показателем низкой ремиссии и общей выживаемости пациентов [9]. Кроме того, показано, что этот фактор способствует развитию резистентности опухолевых клеток к химиопрепаратам [10]. С другой стороны, в ряде работ отмечено положительное влияние E2F1 на эффективность химиотерапии [11, 12].

Одной из трудностей в изучении функции отдельных представителей семейства E2F является наличие кросс-регуляторных механизмов для поддержания баланса между активаторами и репрессорами [13]. Кроме того, транскрипционные активаторы, к которым принадлежит E2F1, также могут «заменять» друг друга при снижении экспрессии одного из них [14]. Нокаут индивидуальных представителей семейства позволит определить перекрывающиеся и уникальные функции каждого из них.

Целью настоящей работы было создание сублинии клеток A549 с нокаутом гена *E2F1* с помощью технологии CRISPR/Cas. Данная модель поможет определить уникальные функции гена *E2F1*, его роль в развитии клеточного ответа на различные воздействия, в частности, химиотерапевтические.

Материалы и методы

Клеточная культура

Клетки линии A549 культивировали в среде DMEM (C455п, Панэко, Россия) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (S1810, Biowest, Южная Америка) и с добавлением антибиотиков пенициллин-стрептомицин (A065', Панэко, Россия).

Плазмида и создание конструкции

Подобранную с помощью программы СНОРСНОР (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) последовательность sgРНК (CRISPR RNA), комплементарную определенному участку в гене *E2F1* (рис. 1А) клонировали в вектор pX458 (Addgene plasmid #48138) по сайту рестрикции BbsI [15]. Данная плазмида содержит последовательность scaffold РНК, необходимую для сбор-

ки полноценной sgРНК (single-guide RNA), нуклеазу Cas9 и ген репортерного белка GFP [15]. Последовательность sgРНК представлена ниже:

смысловая 5'-CACCGGGAGATGATGACGATCTGCG-3'
антисмысловая 5'-AAACCGCAGATCGTCATCATCTCCC-3'

Последовательность sgРНК в вышеуказанном векторе была проверена на отсутствие ошибок методом секвенирования по Сэнгеру.

Трансфекция и сортировка клеток

Трансфекцию плазмиды проводили с помощью липофектамина 3000, согласно инструкции производителя (L3000015, Lipofectamine 3000, Invitrogen). Сортировку клеток осуществляли на проточном цитофлуориметре (BD FACSAria™ III, США) через 48 ч. после трансфекции из расчета одна клетка на одну лунку плоскодонного 96-луночного планшета (30196', SPL Lifesciences, Корея). Клоны наращивали в течение двух недель.

Вестерн блот

Клетки ресуспендировали в лизирующем буфере RIPA (150 мМ хлорид натрия, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, 50 мМ TRIS, pH 8,0). 30 мкг белка наносили в лунку для проведения электрофореза в полиакриламидном геле. Белки из геля переносили на мембрану PVDF (1620177, Bio-Rad, США). Для предотвращения неспецифического связывания антител мембрану блокировали в 5% нежирном молоке (Bio-Rad, США) в течение часа. Инкубацию с первичными антителами (E2F1 (3742, Cell Signaling, США), β -актин (AC026, Abclonal, Китай)) проводили при температуре +4°C в течение ночи. Мембрану отмывали в PBS-Tween и инкубировали 40 мин с вторичными антителами анти-кролик (7074, Cell Signaling, США) при комнатной температуре. Мембрану проявляли с помощью хемилюминесцентного HRP-субстрата (Clarity Western ECL Substrate,

Bio-Rad, США) на хемилюминометре (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare, США).

МТТ анализ

Клетки рассеивали из расчета 1,5x10³ клетки на одну лунку 96-луночного планшета (30196', SPL Lifesciences, Корея) в 5 повторах. В соответствующие дни в лунку добавляли реагент МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) в конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали 2 часа в СО₂-инкубаторе. Среду с реагентом отбирали; в лунку добавляли 100 мкл ДМСО (Ф135, Панэко, Россия). Измерения проводили при длине волны 540 нм на планшетном ридере (TECAN, Австрия).

Количественная ПЦР

РНК из клеток выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. кДНК получали, используя набор RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, США), следуя инструкции производителя. кПЦР ставили с применением красителя EvaGreen (Biotium, США) на амплификаторе Real-Time CFX96 Touch (BioRad, США). Праймеры представлены в **таблице** ниже. Расчет уровней экспрессии генов проводился по методу 2^{- $\Delta\Delta C_t$} .

Статистический анализ

Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Оценку различий между выборками определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Различия признавали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Для создания сублинии клеток A549, нокаутной по гену *E2F1*, мы использовали систему редактирования генома CRISPR/Cas9, успешно примененную

Таблица. Последовательности использованных в исследовании праймеров.

Table. Sequences of primers used in the study.

Название гена	Последовательность прямого праймера (5' → 3')	Последовательность обратного праймера (5' → 3')
<i>APAF1</i>	TTCGTGGTCTGCTGATGGTG	CTTTGTCTCCCAGAGCCTGA
<i>Cyclin E1</i>	AGGGAGCGGGATGCGA	GGGTCTGCACAGACTGCAT
<i>RRM2</i>	TAAATGAAAACCTTGGTGGAGCG	CTTCTTGACACAAGGCATCGTT
<i>MYC</i>	GCATCCACGAAACTTTGCC	CTAACGTTGAGGGGCATCGTC
<i>HPRT1</i>	TTCTTTGCTGACCTGCTGGA	TGTCCCTGTTGACTGGTCA

нами ранее [16, 17]. Последовательность crRNA была подобрана с помощью программы ЧОРСНОР (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) (высокая эффективность, отсутствие комплементарности «на себя» (self-complementarity), минимальное количество нецелевых мишеней (off-targets)) с последующим клонированием ее в вектор рХ458 (см. Материалы и методы). Расположение комплементарного crRNA участка ДНК в гене *E2F1* показано на **рис. 1А**.

С помощью трансфекции конструкция была введена в клетки А549. Через 48 часов клетки, положительные по маркеру GFP, были отсортированы на 96-луночный планшет из расчета одна клетка на одну лунку.

Отсутствие белка E2F1 в клонах было подтверждено с помощью вестерн блот анализа (**рис. 1Б**).

Родительская линия А549 является гетерогенной популяцией клеток [18-20]. Анализ профиля экспрессии генов в единичных клетках показал, что он может различаться между клетками одной популяции. Так, например, путём анализа транскриптома на уровне одной клетки был обнаружен ядерный белок 1, являющийся регулятором устойчивости к воздействию доцетакселя, который невозможно было идентифицировать на уровне целой популяции клеток [21].

При получении моноклональных популяций нокаутных клеток между ними могут быть фенотипиче-

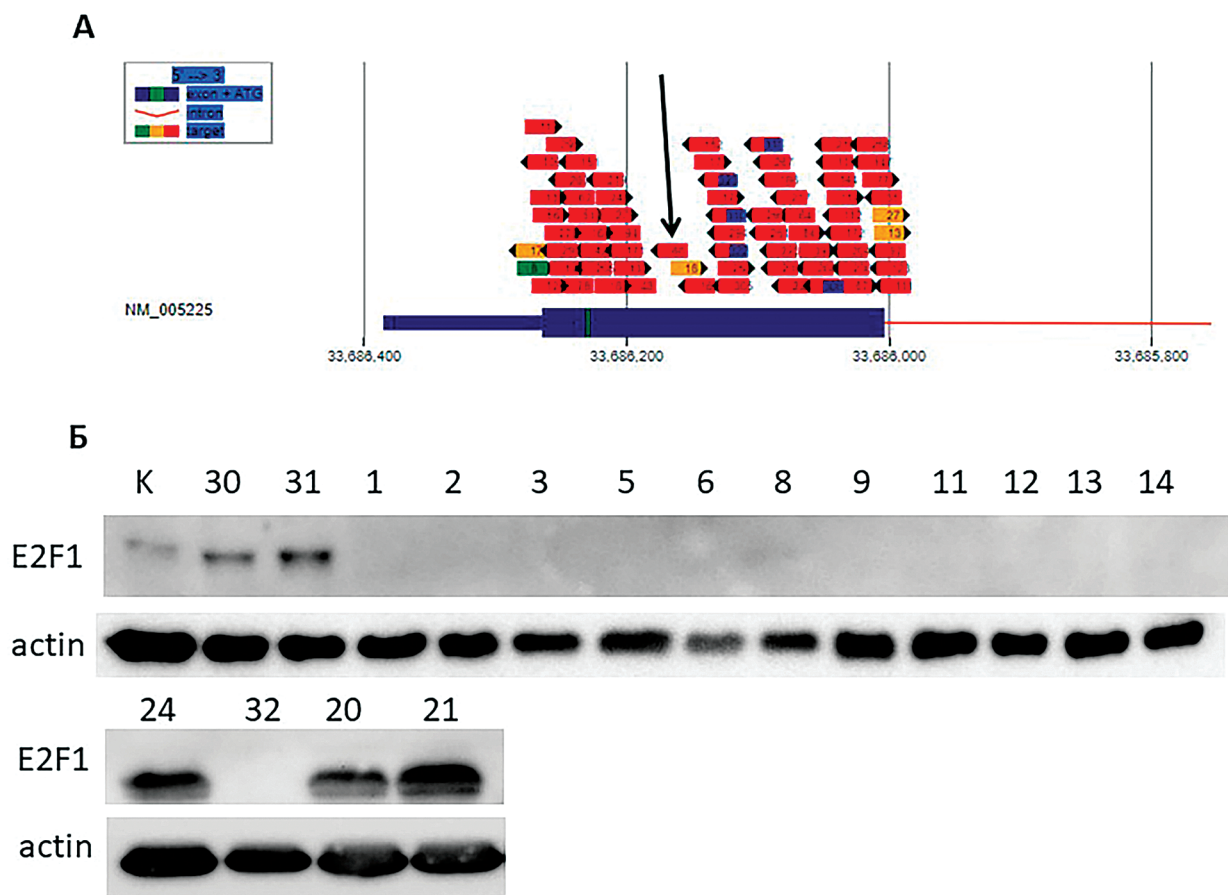


Рис. 1. Получение клонов клеток для создания сублинии А549 с нокаутом гена *E2F1*. А – Показан участок ДНК (первый экзон) в гене *E2F1*, комплементарный подобранной crRNA (стрелкой). Б – Вестерн блот анализ отсортированных клонов на наличие в них белка E2F1. Числами обозначены номера клонов; К – контроль (клетки А549). Окраска на β-актин использовалась в качестве контроля нанесения образцов.

Fig. 1. Generation of cell clones for the A549 subline with *E2F1* gene knockout. А – A DNA region (first exon) in the *E2F1* gene complementary to the selected crRNA (arrow) is shown. Б – Western blot analysis of sorted clones for the presence of E2F1 protein. Numbers indicate clone numbers; K – control (A549 cells). β-actin staining was used as a control for sample loading.

ские и функциональные различия вследствие генетической неоднородности исходной, дикой, линии. Например, было показано, что клоны клеток, полученные из одной исходной родительской линии, значительно

различались между собой в развитии ответа на воздействие на них антителами к рецептору TRAIL [22]. Такие различия приводят к неправильной интерпретации результатов экспериментов вследствие того, что они могут являться следствием гетерогенности исходной линии, а не нокаутом таргетного гена [23]. Поэтому распространена практика объединения клонов с целью получения более гетерогенной конечной популяции [24-26].

Для увеличения генетического разнообразия в конечной нокаутной сублинии клеток A549 мы объединили 5 нокаутных клонов (рис. 1Б) для получения поликлональной популяции. Мы также отобрали и объединили 5 клонов, в которых белок E2F1 присутствовал, с целью получения поликлонального положительного контроля к нокаутной сублинии (рис. 1Б) в дополнение к родительской линии с целью избегания эффекта клональной вариабельности [27].

Для характеристики полученной сублинии клеток был проведен МТТ тест для оценки жизнеспособности и скорости роста клеток в нокаутной, контрольной («собранный» из клонов сортированных клеток, в которых присутствовал белок E2F1) и родительской линиях. Было показано, что нокаут *E2F1* не влияет на пролиферацию клеток при стандартных условиях роста (рис. 2А). Оценку проводили на протяжении недели.

Кроме того, был проведен анализ уровня экспрессии генов-мишеней транскрипционного фактора E2F1: *APAF1*, *Cyclin E1*, *RRM2* и *MYC* [28, 29]. Как и ожидалось, количество мРНК генов, положительно регулируемых E2F1, снижалось в нокаутной сублинии клеток, кроме гена *APAF1*, что может быть связано с тем, что он участвует в развитии апоптоза и активируется в ответ на соответствующие воздействия (рис. 2Б).

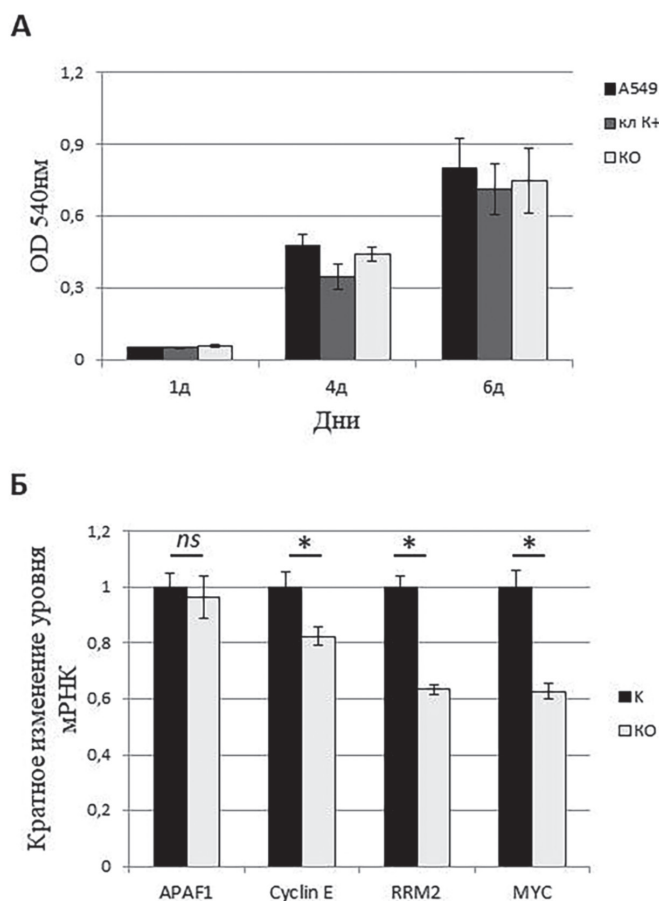


Рис. 2. Характеристика полученной сублинии клеток A549 с нокаутом гена *E2F1*. А – МТТ анализ скорости роста культуры клеток. Кл K+ – отсортированные клоны клеток, содержащие белок E2F1; KO – поликлональная нокаутная сублиния клеток, в которых отсутствует E2F1. Б – Анализ экспрессии генов-мишеней транскрипционного фактора E2F1 методом кПЦР. К – контроль (среднее значение данных, полученных на клетках A549 и кл K+); KO – поликлональная нокаутная сублиния клеток, нокаутных по гену *E2F1*. * – $p < 0,05$.

Fig. 2. Characteristics of the obtained subline of A549 cells with knockout of the *E2F1* gene. А – MTT analysis of the cell culture growth rate. K+ cell clones – sorted cell clones containing the E2F1 protein; KO – polyclonal knockout subline of cells lacking E2F1. Б – Analysis of the expression of target genes of the transcription factor E2F1 by qPCR. K – control (average value of data obtained on A549 cells and K+ cell); KO – polyclonal knockout subline of cells knocked out for the *E2F1* gene. * – $p < 0.05$.

Заключение

В настоящей работе была получена поликлональная сублиния клеток рака легкого A549 с нокаутом гена *E2F1* с применением технологии CRISPR/Cas. Было показано, что отсутствие белка E2F1 не влияет на скорость роста клеток *in vitro*. Наблюдалось небольшое, но значимое снижение экспрессии генов-мишеней транскрипционного фактора E2F1.

Использование данной сублинии предполагается для изучения функций транскрипционного фактора E2F1, определения его роли в клеточных процессах, участия в развитии ответа клетки на различные воздействия (в частности, химиотерапию) и др.

Благодарности. Сортировка клеток поддержана Программой развития МГУ (комплекс для клеточной сортировки на базе FACSria SORP) и лично в. н. с. Поташиковой Дарьей Марковной (МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра клеточной биологии и гистологии, Лаборатория цитологии).

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Литература

- Moriya H. Quantitative nature of overexpression experiments. *Mol Biol Cell*. 2015; 26: 3932-3939. doi: 10.1091/mbc.E15-07-0512.
- Narasimhan V. M., Xue Y., Tyler-Smith C. Human Knockout Carriers: Dead, Diseased, Healthy, or Improved? *Trends Mol Med*. 2016; 22: 341-351. doi: 10.1016/j.molmed.2016.02.006.
- Li H., Yang Y., Hong W., et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2020; 5:1. doi: 10.1038/s41392-019-0089-y.
- Bock C., Datlinger P., Chardon F., et al. High-content CRISPR screening. *N Nat Rev Methods Primers*. 2022;2(1):9. doi: 10.1038/s43586-022-00098-7.
- Ertosun M.G., Hapil F.Z., Osman Nidai O. E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;31:17-25. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.02.001.
- Dubrez L. Regulation of E2F1 Transcription Factor by Ubiquitin Conjugation. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(10):2188. doi: 10.3390/ijms18102188.
- Schaal C., Pillai S., Chellappan S. P. The Rb-E2F transcriptional regulatory pathway in tumor angiogenesis and metastasis. *Adv Cancer Res*. 2014; 121: 147-182. doi: 10.1016/B978-0-12-800249-0.00004-4.
- Meng P., Ghosh R. Transcription addiction: can we garner the Yin and Yang functions of E2F1 for cancer therapy? *Cell Death Dis*. 2014; 5: e1360. doi: 10.1038/cddis.2014.326.
- Li J., Bi W., Lu F., et al. Prognostic role of E2F1 gene expression in human cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2023; 23: 509. doi: 10.1186/s12885-023-10865-8.
- Gao H., Zhou F., Li R., et al. E2F1 inhibits cellular senescence and promotes oxaliplatin resistance in colorectal cancer. *Ann Transl Med*. 2023; 11: 185. doi: 10.21037/atm-22-4054.
- Zhang K., Zhang B., Bai Y., Dai L. E2F1 promotes cancer cell sensitivity to cisplatin by regulating the cellular DNA damage response through miR-26b in esophageal squamous cell carcinoma *J Cancer*. 2020; 11: 301-310. doi: 10.7150/jca.33983.
- Engelmann D., Knoll S., Ewerth D., et al. Functional interplay between E2F1 and chemotherapeutic drugs defines immediate E2F1 target genes crucial for cancer cell death. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67: 931-948. doi: 10.1007/s00018-009-0222-0.
- Chen H. Z., Tsai S. Y., Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 785-797. doi: 10.1038/nrc2696.
- Kong L. J., Chang J. T., Bild A. H., Nevins J. R. Compensation and specificity of function within the E2F family. *Oncogene*. 2007; 26: 321-327. doi: 10.1038/sj.onc.1209817.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat Protoc*, 8, 2281-2308, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
- Персиянцева Н.А., Казанский Д.Б., Татарский В.В., Замкова М.А. Редактирование генома методом CRISPR/Cas для создания сублинии клеток рака легкого человека A549, нокаутной по гену p21. *Медицинская генетика*. 2023;22(11):35-39. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.11.35-39>
- Хамидуллина А.И., Гандалипов Э.Р., Абраменко Я.Е., Чернов К.В., Кирюхина Т.А., Брутер А.В., Татарский В.В. Получение опухолевых линий A549 и MCF7 с нокаутом гена опухолевого супрессора TP53 с помощью CRISPR/Cas9. *Медицинская генетика*. 2023;22(11):27-34. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.11.27-34>
- Chen X., Yu Y., Zheng H., et al. Single-cell transcriptome analysis reveals dynamic changes of the preclinical A549 cancer models, and the mechanism of dacomitinib. *Eur J Pharmacol* 2023; 960: 176046. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.176046.
- Watanabe N., Dickinson D. A., Krzywanski D. M., et al. A549 subclones demonstrate heterogeneity in toxicological sensitivity and antioxidant profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 283: L726-736, doi: 10.1152/ajplung.00025.2002.
- Zhu Q., Zhao X., Zhang Y., et al. Single cell multi-omics reveal intra-cell-line heterogeneity across human cancer cell lines. *Nat Commun*. 2023; 14: 8170. doi: 10.1038/s41467-023-43991-9.
- Schnepp P. M., Shelley G., Dai J., et al. Single-Cell Transcriptomics Analysis Identifies Nuclear Protein 1 as a Regulator of Docetaxel Resistance in Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Res*. 2020; 18: 1290-1301. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0051.
- Boettcher M., Covarrubias S., Biton A., Bet al. Tracing cellular heterogeneity in pooled genetic screens via multi-level barcoding. *BMC Genomics*. 2019; 20: 107. doi: 10.1186/s12864-019-5480-0.
- Westermann L., Li Y., Gocmen B., et al. Wildtype heterogeneity contributes to clonal variability in genome edited cells. *Sci Rep*. 2022; 12: 18211. doi: 10.1038/s41598-022-22885-8.
- Wilcz-Villega E., Carter E., Ironside A., et al. Macrophages induce malignant traits in mammary epithelium via IKKepsilon/TBK1 kinases and the serine biosynthesis pathway *EMBO Mol Med*. 2020; 12: e10491. doi: 10.15252/emmm.201910491.
- Mo J., Borchering N., Jo S., et al. Contrasting roles of different mismatch repair proteins in basal-like breast cancer. *bioRxiv [Preprint]*. 2023 Sep 13:2023.07.20.549745. doi: 10.1101/2023.07.20.549745.
- Yu S., Parameswaran N., Li M., et al. CRABP-II enhances pancreatic cancer cell migration and invasion by stabilizing interleukin 8 expression. *Oncotarget*. 2017; 8: 52432-52444. doi: 10.18632/oncotarget.14194.
- Novakova Z., Milosevic M., Kutil Z., et al. Generation and characterization of human U-2 OS cell lines with the CRISPR/Cas9-edited protoporphyrinogen oxidase IX gene. *Sci Rep*. 2022; 12: 17081. doi: 10.1038/s41598-022-21147-x.
- Muller H., Bracken A. P., Vernell R., et al. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev*. 2001; 15: 267-285. doi: 10.1101/gad.864201.
- Lewis C. S., Voelkel-Johnson C., Smith C. D. Suppression of c-Myc and RRM2 expression in pancreatic cancer cells by the sphingosine kinase-2 inhibitor ABC294640. *Oncotarget*. 2016; 7: 60181-60192. doi: 10.18632/oncotarget.11112.

References

- Moriya H. Quantitative nature of overexpression experiments. *Mol Biol Cell*. 2015; 26: 3932-3939. doi: 10.1091/mbc.E15-07-0512.

2. Narasimhan V. M., Xue Y., Tyler-Smith C. Human Knockout Carriers: Dead, Diseased, Healthy, or Improved? *Trends Mol Med.* 2016; 22: 341-351. doi: 10.1016/j.molmed.2016.02.006.
3. Li H., Yang Y., Hong W., et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5:1. doi: 10.1038/s41392-019-0089-y.
4. Bock C., Datlinger P., Chardon F., et al. High-content CRISPR screening. *N Nat Rev Methods Primers.* 2022;2(1):9. doi: 10.1038/s43586-022-00098-7.
5. Ertosun M.G., Hapil F.Z., Osman Nidai O. E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;31:17-25. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.02.001.
6. Dubrez L. Regulation of E2F1 Transcription Factor by Ubiquitin Conjugation. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(10):2188. doi: 10.3390/ijms18102188.
7. Schaal C., Pillai S., Chellappan S. P. The Rb-E2F transcriptional regulatory pathway in tumor angiogenesis and metastasis. *Adv Cancer Res.* 2014; 121: 147-182. doi: 10.1016/B978-0-12-800249-0.00004-4.
8. Meng P., Ghosh R. Transcription addiction: can we garner the Yin and Yang functions of E2F1 for cancer therapy? *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1360. doi: 10.1038/cddis.2014.326.
9. Li J., Bi W., Lu F., Pet al. Prognostic role of E2F1 gene expression in human cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 2023; 23: 509. doi: 10.1186/s12885-023-10865-8.
10. Gao H., Zhou F., Li R., et al. E2F1 inhibits cellular senescence and promotes oxaliplatin resistance in colorectal cancer. *Ann Transl Med.* 2023; 11: 185. doi: 10.21037/atm-22-4054.
11. Zhang K., Zhang B., Bai Y., Dai L. E2F1 promotes cancer cell sensitivity to cisplatin by regulating the cellular DNA damage response through miR-26b in esophageal squamous cell carcinoma *J Cancer.* 2020; 11: 301-310. doi: 10.7150/jca.33983.
12. Engelmann D., Knoll S., Ewerth D., et al. Functional interplay between E2F1 and chemotherapeutic drugs defines immediate E2F1 target genes crucial for cancer cell death. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67: 931-948. doi: 10.1007/s00018-009-0222-0.
13. Chen H. Z., Tsai S. Y., Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 785-797. doi: 10.1038/nrc2696.
14. Kong L. J., Chang J. T., Bild A. H., Nevins J. R. Compensation and specificity of function within the E2F family. *Oncogene.* 2007; 26: 321-327. doi: 10.1038/sj.onc.1209817.
15. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat Protoc.* 8, 2281-2308, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
16. Persiyantseva N.A., Kazansky D.B., Tatarskiy V.V., Zamkova M.A. Redaktirovaniye genoma metodom CRISPR/Cas dlya sozdaniya sublinii kletok raka legkogo cheloveka A549, nokautnoy po genu r21 [Genome editing by CRISPR/Cas to generate A549 human lung cancer subline knockout for the p21 gene]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics].* 2023;22(11):35-39. (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.11.35-39>
17. Khamidullina A.I., Gandalipov E.R., Abramenko Y.E., et al.. Polucheniye opukholevykh liniy A549 i MCF7 s nokautom gena opukholevogo supressora TP53 s pomoshch'yu CRISPR/Cas9 [Creation of A549 and MCF7 tumor sublines with knockout of TP53 using CRISPR/Cas9]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics].* 2023;22(11):27-34. (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.11.27-34>
18. Chen X., Yu Y., Zheng H., et al. Single-cell transcriptome analysis reveals dynamic changes of the preclinical A549 cancer models, and the mechanism of dacomitinib. *Eur J Pharmacol* 2023; 960: 176046. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.176046.
19. Watanabe N., Dickinson. D. A., Krzywanski D. M., Iet al. A549 subclones demonstrate heterogeneity in toxicological sensitivity and antioxidant profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283: L726-736, doi: 10.1152/ajplung.00025.2002.
20. Zhu Q., Zhao X., Zhang Y., et al. Single cell multi-omics reveal intracellular heterogeneity across human cancer cell lines. *Nat Commun.* 2023; 14: 8170. doi: 10.1038/s41467-023-43991-9.
21. Schnepf P. M., Shelley G., Dai J., et al. Single-Cell Transcriptomics Analysis Identifies Nuclear Protein 1 as a Regulator of Docetaxel Resistance in Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Res.* 2020; 18: 1290-1301. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0051.
22. Boettcher M., Covarrubias S., Biton A., Bet al. Tracing cellular heterogeneity in pooled genetic screens via multi-level barcoding. *BMC Genomics.* 2019; 20: 107. doi: 10.1186/s12864-019-5480-0.
23. Westermann L., Li Y., Gocmen B., et al. Wildtype heterogeneity contributes to clonal variability in genome edited cells. *Sci Rep.* 2022; 12: 18211. doi: 10.1038/s41598-022-22885-8.
24. Wilcz-Villega E., Carter E., Ironside A., et al. Macrophages induce malignant traits in mammary epithelium via IKKepsilon/TBK1 kinases and the serine biosynthesis pathway *EMBO Mol Med.* 2020; 12: e10491. doi: 10.15252/emmm.201910491.
25. Mo J., Borcherding N., Jo S., et al. Contrasting roles of different mismatch repair proteins in basal-like breast cancer. *bioRxiv [Preprint].* 2023 Sep 13:2023.07.20.549745. doi: 10.1101/2023.07.20.549745.
26. Yu S., Parameswaran N., Li M., et al. CRABP-II enhances pancreatic cancer cell migration and invasion by stabilizing interleukin 8 expression. *Oncotarget.* 2017; 8: 52432-52444. doi: 10.18632/oncotarget.14194.
27. Novakova Z., Milosevic M., Kutil Z., et al. Generation and characterization of human U-2 OS cell lines with the CRISPR/Cas9-edited protoporphyrinogen oxidase IX gene. *Sci Rep.* 2022; 12: 17081. doi: 10.1038/s41598-022-21147-x.
28. Muller H., Bracken A. P., Vernell R., et al. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev.* 2001; 15: 267-285. doi: 10.1101/gad.864201.
29. Lewis C. S., Voelkel-Johnson C., Smith C. D. Suppression of c-Myc and RRM2 expression in pancreatic cancer cells by the sphingosine kinase-2 inhibitor ABC294640. *Oncotarget.* 2016; 7: 60181-60192. doi: 10.18632/oncotarget.11112.